# عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus stearothermophilus* المنتجة لإنزيم Thermolysin من الترب العراقية وتحديد عوامل التغذية

خلود عبد الاله الخفاجي

## الملخص

تعد سبورات النوع البكتيري ***Bacillus stearothermophilus*** من اكثر السبورات مقاومة للظروف البيئية المتطرفة وهي تكثر في جميع انواع ترب المناطق الحارة والباردة.

ينتج هذا النوع البكتيري انزيم البروتييز المتعادل والمقاوم لدرجات الحرارة المرتفعة **Thermolysin** والذي يفرز الى خارج الخلايا. تؤثر إضافة بعض المواد إلى وسط الإنتاج إيجاباً أو سلباً في الإنتاج. لهذا هدف البحث إلى عزل وتشخيص بكتريا ***B. stearothermophilus*** من مختلف الترب العراقية وتحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم **Thermolysin** ذي التطبيقات الواسعة في مجال الإنتاج الغذائي والصناعي.

تم الحصول على **33** عزلة بكتيرية محبة للحرارة تعود إلى النوع البكتيري ***B. stearothermophilus*** من **25** نموذج تربة مختلفة لمحافظات العراق.

فحصت قابلية إنتاج العزلات لإنزيم **Thermolysin** نوعياً وكمياً وتبين اختلاف العزلات من حيث الإنتاجية ووجد إن العزلة ***B. stearothermophilus*** **SK422** منتجة لأعلى كمية من الإنزيم وصلت إلى **900** وحدة/ ملليتر.

استعمل وسط إنتاجي معقد أساس يحتوي على التربتون وخلاصة الخميرة. وتم تحديد التركيز الأمثل من التربتون وخلاصة الخميرة ليكون **0.65** و **0.5%** على التتابع. وأمكن استبدال التربتون بالببتون أو مهضوم فول الصويا (سويتون) أو بانتون دون أن يؤثر ذلك في الإنتاج. وقد حدد تأثير تركيز بعض الأملاح بصورة مفردة أو بصورة خلطيه في إنتاج الإنزيم في الوسط الاساس المعقد، حيث وجد إن التركيز الأمثل للإنتاج هو **0.25%** عند استعمال ملحي كلوريد الصوديوم اوكلوريد البوتاسيوم والتركيز **0.5%** عند استعمال أملاح كبريتات المغنيسيوم او كلوريد الكالسيوم او كبريتات الامونيوم كما وجد إن الخليط الملحي كبريتات الامونيوم **0.5%** وكلوريد البوتاسيوم **0.25%** أعطى نتائج ايجابية في إنتاج الإنزيم تفوق استعمال الأملاح بصورة مفردة.

كما درس تأثير إضافة بعض السكريات (السداسية والخماسية والمتعددة والبولي يول) إلى الوسط الزرعي المعقد وقد كان لتركيز **0.25%** سكر الكلوكوز تأثير ايجابي في الإنتاج اعقبه **0.5%**سكر الكالكتوز.

## المقدمة

تنتج انزيمات البروتيز العديدُ من الاحياء المجهرية. وتعد هذه الانزيمات من اهم الانزيمات الصناعية حيث استخدمت في صناعة المنظفات الحيوية وفي تطرية الجلود وازالة الاصواف منها. وفي مختلف الصناعات الغذائية. وفي مجال الطب وصناعة المستحضرات الصيدلانية. قسمت هذه الانزيمات الى اربع مجموعات اعتماداً على خصائصها الى انزيمات بروتيز سيرينية (تعمل في محيط قاعدي) وبروتييزات اسبارتية وكربوكسيلية (تعمل في محيط حامضي) وانزيمات الميتالوبروتيز (تعمل في محيط متعادل) (**1**).

يعود انزيم **thermolysin** المنتج من النوع البكتيري المحب لدرجات الحرارة المرتفعة ***Bacillus stearothermophilus*** الى انزيمات الميتالوبروتيز وهو انزيم مقاوم لدرجات الحرارة المرتفعة مقارنة مع مثيلاته من

وزارة العلوم والتكنولوجيا، بغداد، العراق.

انزيمات الميتالوبروتيز المنتجة من مصادر متوسطة درجات الحرارة (9). كما وتنتج العديد من انواع جنس ***Bacillus*** انزيمات بروتييز متعادلة خارج خلوية والتي تشابه انزيم **thermolysin** من ناحية التركيب والثبات الحراري (**1.6**) وتعد خاصية الثبات الحراري لانزيم البروتييز من العوامل المهمة والمرغوبة في مجال الصناعات الغذائية (**20**).

تصنع انزيمات البروتيز في الاغشية الخلوية ابتداء ثم تفرز بشكلها النهائي الى الوسط الزرعي (**1**) وتمتلك انزيمات البروتييز دوراً مهماً في الكائنات المجهرية حيث تساعد على تحليل البروتينات الموجودة في الوسط الغذائي لغرض استخدامها كمصادر نتروجينية للنمو والتكاثر (**16**). وتؤثر مكونات الوسط الزرعي في انتاج الانزيمات خارج خلوية بصورة كبيرة ذلك من خلال حث أو كبت انتاجها بوساطة الارتباط المتخصص مع الموقع الحفزي للانتاج (**9**) حيث تعمل الاحماض الامينية على تثبيط البروتيزات خارج خلوية المنتجة من بكتريا جنس ***Bacillus*** (**2**، **3**، **6**)، كما وجد ان اضافة البروتينات والببتيدات الى الوسط الزرعي يحفز انتاج العديد من البروتيزات (**4**) وقد استعملت الاحماض العضوية مصدراً وحيداً للكربون في انتاج كمية كبيرة من البروتيز القاعدي لانواع مختلفة من جنس ***Bacillus*** بينما وجد ان اضافة السكريات الى الوسط الزرعي تثبط انتاج الثرمولايسين (**6**) لذلك من الصعوبة البالغة وضع فكرة موحدة حول تأثير مصدر مغذٍ معين لجميع الاحياء المجهرية. لذا هدف البحث الى عزل وتشخيص بكتريا محبة للحرارة تابعة للنوع ***B. stearothermophilus*** من مختلف نماذج ترب محافظات بغداد والموصل والنجف الأشرف والبصرة وتحديد تأثير المواد المغذية في انتاج انزيم **thermolysin**.

# المواد وطرائق البحث

## جمع النماذج

جمعت نماذج تربة من مناطق مختلفة من محافظات بغداد والموصل والنجف والبصرة في عام **2002** ووضعت في اكياس ورقية نظيفة لحين اجراء البحث لاحقا خلال السنة ذاتها في مختبرات الدائرة الزراعية– منظمة الطاقة الذرية العراقية سابقا– بغداد.

## عزل البكتريا المحبة للحرارة المنتجة لانزيم البروتيز

تم وزن **2** غرام تربة جافة وعلقت في **10**مللتر ماء مقطر معقم و مزجت جيدا ثم تركت مدة لتركد. اخذ **0.25** مللتر من معلق التربة واضيف الى **25** مللتر وسط لوريا السائل (**1**% تربتون، **0.5**% خلاصة الخميرة و**0.5**% ملح كلوريد الصوديوم) في دورق سعة **100**مللتر وحضن بدرجة **55**م لمدة **18**ساعة (7).

نشر **0.1** مللتر من النماذج التي حصل فيها نمو على وسط لوريا الصلب الحاوي على **1**% حليب مقشود وعلى وسط لوريا الصلب الحاوي على **1**% كازاين. حضنت الاطباق بدرجة حرارة **55** م لمدة **18**ساعة. وقيست اقطار الهالات المتكونة حول المستعمرات. وحسبت نسبة قطر الهالة الى قطر المستعمرة واعتمدت هذه النسبة في تحديد العزلات المنتجة لانزيم البروتز (**18**).

## تشخيص العزلات

### الصفات المظهرية

درست الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على وسط لوريا الصلب التي تناولت حجمها ولونها وشكل حافاتها. كما اجري الفحص المجهري لخلايا البكتريا من مزارع فتية بعمر **18** ساعة ومزارع ذات عمر **48** ساعة بعد تصبيغها بصبغة كرام وملاحظة شكل الخلايا وتجمعاتها ووجود او عدم وجود السبور الداخلي، موقع السبور الداخلي إن وجد وشكله.

**الصفات البايوكيميائية**

اختيرت المستعمرات البكترية والتي تبين عند الفحص المجهري لشرائح مصبوغة بصبغة كرام انها ذات خلايا عصويه الشكل مقاربة لجنس ***Bacillus***. اجريت عليها الفحوص البايوكيميائية للتعرف على صفاتها ولتحديد جنس البكتريا ونوعها اعتماداً على الصفات الواردة في **Claus** و **Berkeley** (7).

**غربلة عزلات *B.stearothermophilus* الكفؤة في انتاج انزيم البروتيز في الوسط السائل**

زرعت العزلات في **10** مللتر وسط لوريا السَائل وحضنت لمدة **18** ساعة بدرجة حرارة **55** م مع رج مناسب. ونبذ المزروع البكتيري مركزياً بسرعة **10000** دورة بالدقيقة لمدة عشر دقائق واستعمل الرائق بعد ذلك لقياس الفعالية.

**قياس الفعالية**

حددت الفعالية من خلال مزج **0.2** من راشح المزرعة البكتيرية مع **1.8** مللتر من محلول **1%** كازاين ذي رقم هيدروجيني **7**. حضن بدرجة حرارة **55** م لمدة عشر دقائق اوقف التفاعل عند انتهاء الوقت باضافة **3** مللتر من محلول **5%** مادة **trichloroacetic acid** (**TCA**) ووضعت الانابيب في حمام ثلجي لمدة نصف ساعة ثم قرئت امتصاصية الراشح عند الطول الموجي **280** نانومتر. وتعرف وحدة الفعالية بانها كمية الانزيم التي تنتج مزيجاً من مواد ذائبة في ثلاثي كلوريد حامض الخليك والتي تساوي مايكروغرام واحد من التايروسين المنتج من الكازاين في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف التقدير (**5**).

**العزلة البكتيرية المستخدمة في تحديد العوامل التغذوية**

أستخدمت العزلة البكتيرية المحلية ***Bacillus stearothermophilus* SK422** في هذه الدراسة. نميت العزلة على اكار مائل لوسط لوريا بدرجة حرارة **65** م لمدة **18**ساعة واستعمل كمزروع خزين لتلقيح الاوساط السائلة. (نفذت جميع التجارب بثلاثة مكررات وأخذ متوسط حسابي للنتائج المستحصلة)

**انتاج انزيم الثرمولايسين من العزلة *Bacillus stearothermophilu* SK422**

لقح حجم **20** مللتر من وسط لوريا السائل ذي الرقم الهيدروجيني **7** بملء عروة ناقل من المزروع الخزين وحضن بدرجة حرارة **65** م لمدة ست ساعات في حمام مائي هزاز استعمل **1.5**مللتر من المزروع في تلقيح **50** مللتر من وسط لوريا السائل ذي الرقم الهيدروجيني **7** وحضن بدرجة حرارة **55**م في حمام مائي هزاز لمدد مختلفة (**18**، **28** و**48** ساعة). نبذ المزروع البكتيري بسرعة **10000** دورة/دقيقة واستعمل الرائق في تقدير عدد وحدات الانزيم.

**تأثير المواد المغذية**

**المواد المغذية النتروجينية**

حدد التركيز الامثل من مستخلص الخميرة بأضافة تراكيز متدرجة من مستخلص الخميرة تراوحت بين **0-1.5%** الى وسط اساس **1%** تربتون وبواقع **0.05%** بين تركيز واخر. وتم تحديد التركيز الامثل من التربتون بإضافة تركيز متدرج من التربتون تراوح بين **0- 2 %** الى وسط اساس احتوى على التركيز الامثل من مستخلص الخميرة وبواقع **0.05** بين تركيز واخر.

ولتحديد امكانية أستبدال التربتون بمغذيات اخرى تم استعمال وسط اساس احتوى على التركيز الامثل من مستخلص الخميرة وأضيف اليه تراكيز **0.3** او **0.6** او **0.9** من مهضوم فول الصويا او البانتون او الببتون.

**الاملاح اللاعضوية**

**تم تحديد تراكيز الاملاح اللاعضوية في الوسط الزرعي الاساس المعقد (0.5% مستخلص الخميرة و650% تربتون) بإضافة تركيز متدرج من أملاح $(NH4)_2SO_4$، $CaCl_2$، $MgSO_4$، KCl وNaCl تراوحت 0-1% وبفرق يقدر 0.125% بين تركيز وآخر الذي يليه.**

**تم الدمج بين الاملاح اللاعضوية بتراكيزها المثلى ومقارنتها مع وسط السيطرة ومع الوسط الحاوي على الاملاح بصورة مفردة وذلك لتحديد تأثير الاملاح بصورة مفردة او بصورة مزيج في انتاج الانزيم. كما تم تحديد تأثير المزيج الملحي ($NH_4Cl$ بواقع 0.01%، $FeSO_4$ بواقع 0.001% و $MnSO_4$ بواقع 0.1%) في انتاج الانزيم بأضافة تركيز 1% منه الى الوسط الزرعي الاساس المعقد. ولتحديد تأثير النظام الدارىء تمت أضافة محلول 1% من $K_2HPO_4$ الى الوسط الزرعي بصورة تدريجية ليعطي وسطاً ذا رقم هيدروجيني 7.5 وقورنت انتاجيته مع انتاجية الوسط الزرعي المعقد الاساس ذي الرقم الهيدروجيني 7.**

**حدد تأثير اضافة بعض السكريات في انتاج انزيم thermolysin من خلال اضافة تركيز 1% من سكريات الكلوكوز والكالكتوز والمالتوز والمانتول والكلسرول والفركتوز واللاكتوز والسكروز و النشاء الذائب الى الوسط الزرعي المعقد الاساس ذي الرقم الهيدروجيني 7.5. تم تحديد تركيز السكر الامثل في أنتاج هذا الانزيم من خلال إضافة تراكيز 0.25، 0.05 و1% من السكريات التي أدت الى زيادة في انتاجه.**

**ولتحديد توليفة الوسط الغذائي الأمثل لانتاج الانزيم تم دمج التراكيز المثلى من المواد المغذية المستحصلة من التجارب السابقة ومقارنتها مع الوسط الزرعي المعقد الاساس.**

# النتائج والمناقشة

**عزل وتشخيص بكتريا *B. stearothermophilus***

**انتقيت 55 مستعمرة مفردة نقية مختلفة الشكل والجدول (1) يمثل المناطق التي اخذت منها النماذج وعزلت المستعمرات البكتيرية منها.**

**جرى تنمية العزلات النقية بشكل مستقل تحت درجة حرارة 65 م لمدة 18 ساعة وقد أمكن الحصول على 30 عزلة استطاعت النمو في مثل هذه الدرجة من الحرارة واظهر الفحص المجهري لشرائح مصبوغة بصبغة كرام ان الخلايا عصوية الشكل، ذات سبور طرفي Terminal او تحت طرفي Sub terminal اسطواني الشكل ادى البعض من هذه السبورات الى انتفاخ الخليه الام (sporangium swollen).**

**تراوح شكل المستعمرات على وسط لوريا الصلب بين الشكل الدائري او البيضوي ذي حافة متعرجة وسطح املس محدب ولون كريمي. اما الشكل الاخر فكان ذا سطح جاف نوعاً ما وحافات متعرجة لها صفة الانتشار على سطح الاكار.**

**توجد الكائنات المجهرية المحبة للحرارة المكونة للسبورات في مختلف الظروف البيئية غير الاعتيادية حيث توجد السبورات بشكلها الكامن (dormant spore). التي امكن عزلها من الثلج المتساقط ورمال الصحراء والحليب وكذلك عزلت بكتريا *B.stearothermophilus* من اعماق البحار والمناطق الباردة (1، 7، 14).**

**شخصت 33 عزلة على انها تعود لنوع *B.stearothermophilus* وذلك اعتماداً على الصفات المذكورة في Claus وBerkeley (7) حيث وجد ان العزلات تنمو بدرجات الحرارة العالية 65م لاتنمو بدرجة حرارة 37م، تمتلك القابلية على تخمير الكلوكوز دون غاز لها القدرة على استهلاك النشا، لا تنتج الاسيتوين acetoin، والاندول، لها القدرة على اختزال النترات وقد عدت مثل هذه الصفات مثالية لهذه البكتريا (14). كما تم اعتماد صفة عدم قدرة عزلات البكتريا المحبة للحرارة المعزولة في هذا البحث على النمو في الارقام الهيدروجينية المنخفضة وفي درجة حرارة**

جدول 1: المناطق التي اخذت منها نماذج الترب وعزلات *Bacillus* المعزولة والمحبة للحرارة

| المحافظة | المنطقة | ارقام النماذج | نوع التربة | عدد العزلات | عزلات *Bacillus* المحبة للحرارة |
|---|---|---|---|---|---|
| بغداد | الكرادة | 2 | زراعية | | |
| | | 4 | | | |
| | | 19 | | 3 | SK 19(1),SK 19(2), SK 19(3) |
| | | 20 | | | |
| | | 32 | | | |
| | | 21 | مخلفات عضوية compost | | |
| | الجادرية | 3 | زراعية | | |
| | | 31 | | | |
| | البصرة | 5 | زراعية | 2 | |
| | | 8 | | | |
| | | 9 | | | |
| | الشرطة الخامسة | 1 | زراعية | | |
| | | 26 | | | |
| | جسر ديالى والتويثه | 6 | زراعية | 1 | |
| | | 7 | | 2 | |
| | | 12 | | | |
| | | 13 | | | |
| | | 14 | | | |
| | | 15 | | | |
| | | 16 | | | |
| | | 17 | | | |
| | | 44 | | | |
| | | 24 | | 6 | |
| | | 37 | حقل ذرة | 1 | SK37(1) |
| | | 38 | | 2 | SK38(1) , SK 38(2) |
| | | 42 | مخلفات عضوية | 4 | SK42(1) ,SK42(2), SK42(3), SK42(4) |
| | | 39 | | 4 | SK39(1),SK39(2) |
| | | 40 | | 1 | SK40 |
| | | 41 | رملية | | |
| | | 43 | ارض مالحة | | |
| | سلمان باك | 45 | زراعيه | 6 | SK45(1) , SK45(2), SK 45(3), SK 45(6) |
| | | 46 | | 5 | SK46(1), SK 46(2), SK 46(3), SK 46 (4) |
| | | 47 | | | |
| | ابو غريب | 25 | زراعية | | |
| | جميلة | 10 | | | |
| | بغداد الجديدة | 22 | | | |
| | العامرية | 18 | | | |
| | ارض قرب نهر دجلة | 48 | | | |
| | | 49 | | | |
| | | 50 | | 2 | SK 50 (1) , sk 50 (2) |
| | | 51 | | | |
| | | 52 | | | |
| | مناطق متفرقة | 23 | زراعية | 1 | SK 23 |
| | | 11 | | | |
| | | 30 | | | |
| النجف | الكوفة | 33 | | 3 | |
| | | 34 | رملية | 2 | (1) SK 34 |
| | | 35 | | 1 | |
| | | 36 | | 5 | |
| الموصل | غابات الموصل | 27 | | | |
| | | 28 | | | |
| | | 29 | | 4 | |

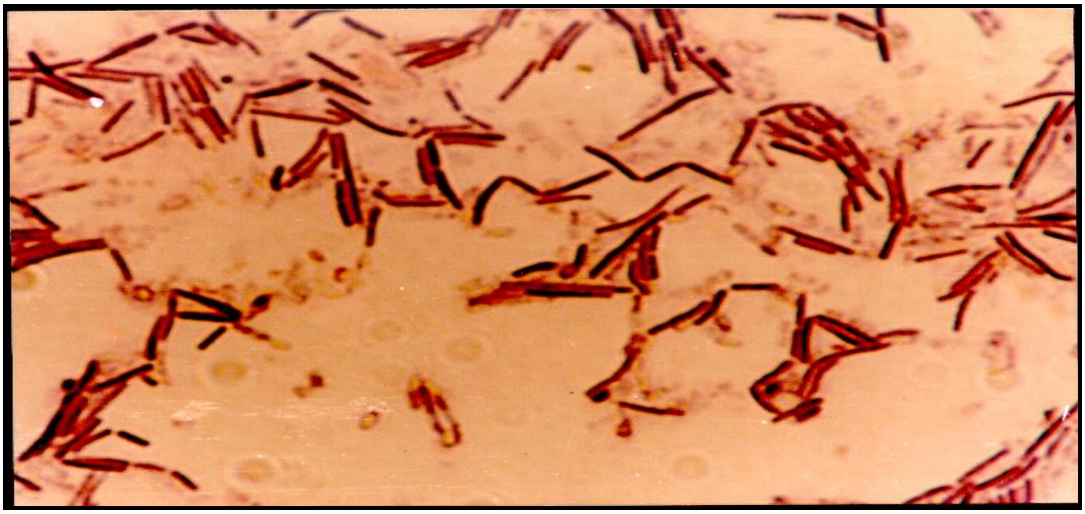
37م في تشخيص النوع *B. stearothermophilus* وذلك اعتماداً على Claus وBerkeley (7)، Ito (11) حيث عرف عن هذا النوع البكتيري انه يسبب تلف الأغذية غير الحامضية فنمو البكتريا يكون في مدى ضيق من الارقام الهيدروجينية يتراوح بين 6.5–9 مما يميزها عن البكتيريا المحبة للحرارة والمسببة لتلف الاغذية الحامضية التي تعود الى النوع *B. coagulans* وعن بكتريا *B. acidocaldarius* اللتين ينَموان في رقم هيدروجيني اقل من 4.5 (11، 19). وقد فسر عدم القابلية على النمو في المحيط الحامضي لبعض انواع البكتريا الى ان الرقم الهيدروجيني المنخفض للوسط يعمل على تثبيط الفعاليات الحيوية نتيجة لاختلال نضح الخلايا وقابلية المواد على الذوبان وترسيب البروتينات بسبب زيادة الحموضة داخل الخلايا البكتيرية (10).

بينت الغربلة النوعية لانتاج أنزيم thermolysin تباين انتاج االنزيم من قبل العزلات المشخصة حيث اعطت عشر عزلات انتاجية لا بأس بها من انزيم thermolysin وقد تراوحت نسبة قطر الهالة الى قطر المستعمرة من 0.8 – 0.4 (جدول 2). يتضح من الجدول (2) ان العزلة البكتيرية *B.stearothermophilus* SK422 تنتج اكبر كمية من الانزيم حيث اعطت نسبة 0.8 قطر هالة:قطر مستعمرة ويدرج جدول (3) الصفات التشخيصية للعزلة *B.stearothermophilus* SK422.

جدول 2: كفاءة انتاج انزيم thermolysin لعشر عزلات من النوع *B.stearothermophilus*

| العزلة البكتيرية | نسبة قطر الهالة:قطر المستعمرة |
|---|---|
| *B.stearothermophilus* SK422 | 0.8 |
| *B.stearothermophilus* SK451 | 0.7 |
| *B.stearothermophilus* aa6 | 0.7 |
| *B.stearothermophilus* SK391 | 0.6 |
| *B.stearothermophilus* SK461 | 0.5 |
| *B.stearothermophilus* SK432 | 0.5 |
| *B.stearothermophilus* SK193 | 0.4 |
| *B.stearothermophilus* SK40 | 0.4 |
| *B.stearothermophilus* SK191 | 0.4 |

كما يوضح شكل (1) ترتيب وشكل خلايا العزلة*B.stearothermophilus* SK422 عند فحص شرائح مصبوغة بصبغة كرام.



شكل 1: فحص مجهري لشرائح مصبوغة بصبغة كرام توضح فيها خلايا العزلة*B.stearothermophilus* SK422

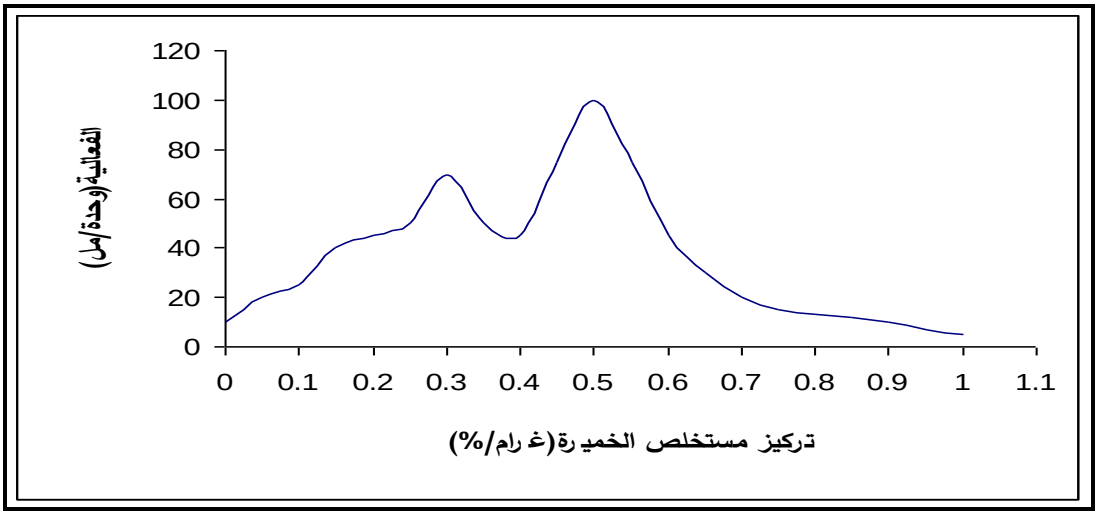
جدول 3: الاختبارات المستخدمة في تشخيص *B. stearothermophilus* SK422

| الصفة | النتيجة |
|---|---|
| Catalase | + |
| Oxidase | + |
| Anaerobic growth | - |
| Voges broskaur test | - |
| PH in VP broth | |
| <6 | + |
| >7 | - |
| Acid from | |
| D-glucose | + |
| L-Arabinose | + |
| D-xylose | + |
| D- Mannitol | + |
| Gas from glucose | - |
| Hydrolysis of | |
| Gelatin | + |
| Starch | + |
| Indol | - |
| Utilization of citrate | - |
| Nitrate reduced to nitrite | + |
| Growth at PH | |
| 6.8 | + |
| 5.7 | - |
| Growth in Nacl | |
| 2% | + |
| 5% | + |
| 7% | |
| 10% | |
| Growth at | |
| 5C | - |
| 10C | - |
| 30C | - |
| 40C | |
| 50C | + |
| 55C | + |
| 65C | + |
| Growth with lysozyme | - |
| Motility | + |

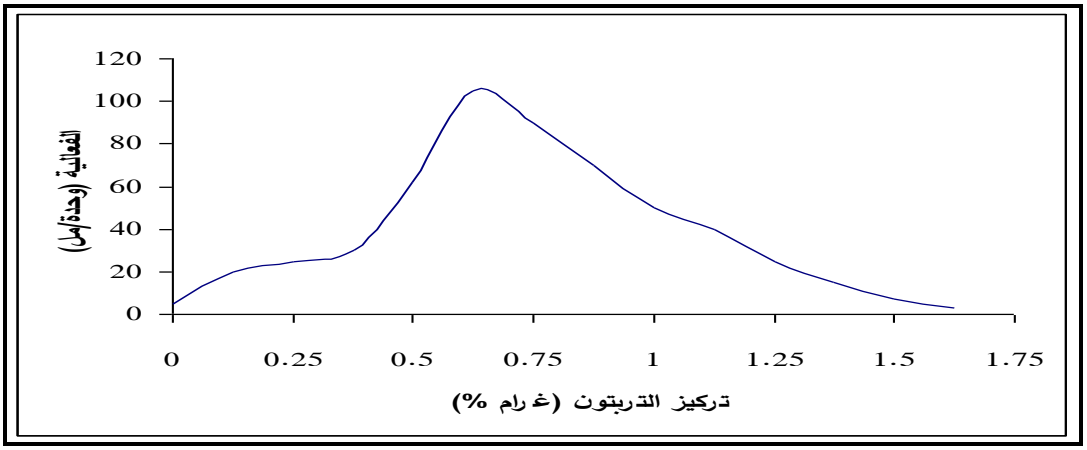
## تأثير المواد المغذية في أنتاج الانزيم

### المواد النتروجينية

وجد ان اعلى انتاجية للانزيم كانت عند التركيز **0.5%** من مستخلص الخميرة وبعد **24** ساعة حضن. وقد وجد ان زيادة تراكيز مستخلص الخميرة او نقصانها عن **0.5%** ادى الى انخفاض انتاج الانزيم (شكل **2**). كما وجد ان التركيز الامثل من التربتون هو **0.65%** (شكل **3**).




**شكل 2: تأثير تركيز مستخلص الخميرة في انتاج انزيم thermolysin من العزلة *B.stearothermophilus*SK422**




**شكل 3: تأثير تركيز التربتون في انتاج انزيم thermolysin من العزلة *B .stearothermophilus*SK422**

وقد وجد أمكانية استبدال تركيز **0.65%** تربتون المستخدم في الوسط الاساس بتركيز **0.3%** مهضوم فول الصويا، **0.3%** بانتون و**0.6%** ببتون دون ان يؤثر ذلك في الانتاج (جدول **4**).

**جدول 4: تأثير استعمال المواد المغذية النتروجينية المختلفة في انتاج انزيم الثرمولايسين العزلة *B.stearothermophilus* SK422**

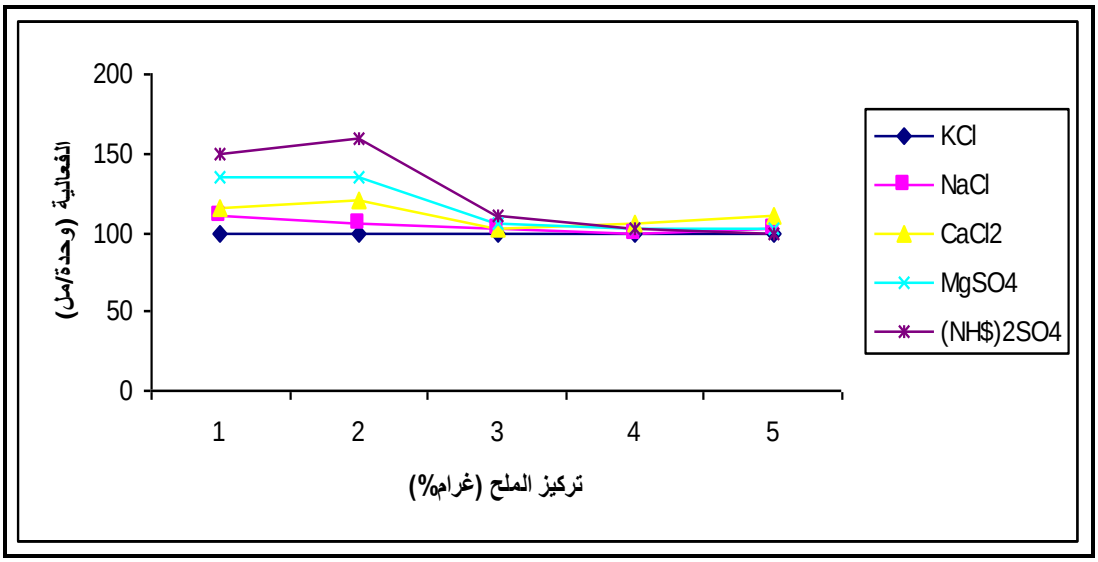
| فعالية انزيم الثرمولايسين (وحدة /مل ×10) | | | | |
|---|---|---|---|---|
| تركيز المواد النتروجينية | تربتون | مهضوم فول الصويا | بانتون | ببتون |
| 0.3% | 80 | 105 | 108 | 90 |
| 0.6% | 120 | 110 | 100 | 105 |
| 0.9% | 80 | 75 | 75 | 75 |

(استعمل وسط **0.5** مستخلص خميرة ودرجة حرارة **55**م ولمدة **24** ساعة)

اهتمت العديد من الابحاث بمكونات الاوساط الزرعية المستعملة في انتاج الانزيمات وأيجاد التركيبة المثلى للوسط الزرعي التي تحفز انتاج الأنزيم من العزلة ***Bacillus stearothermophilus*1503** ومن النوع ***B.subtilus*** (**15**، **4**).

تمت أضافة تراكيز ملحية مختلفة الى الوسط الاساس المعقد المتكون من 0.5% مستخلص خميرة و0.65% تربتون وقد وجد ان أضافة 0.25% من ملحي كلوريد الصوديوم وكلوريد الكالسيوم ادى الى زيادة ضئيلة في انتاج الانزيم مقارنة مع الوسط الاساس المعقد. كما وجد ان تركيز 0.5% من املاح كبريتات المغنيسيوم وكبريتات الامونيوم وكلوريد الكالسيوم هو الامثل لانتاج الانزيم حيث ادت اضافة كبريتات المغنيسيوم وكبريتات الامونيوم الى زيادة الانتاج بنسبة 40و15 % على التوالي (شكل 4).

ادى استعمال خليط الاملاح 0.25% من كلوريد البوتاسيوم و 0.5% من كبريتات الامونيوم الى زيادة انتاج انزيم thermolysin بمقدار 50 وحدة/ مل ×10 (جدول 5).




شكل 4: تأثيرتركيز الاملاح في انتاج انزيم thermolysin من العزلة*B.stearothermophilus*SK422

جدول 5: تأثير الاملاح الاعضوية في انتاج انزيم thermolysin من العزلة *B.stearothermophilus* SK422

| المعاملة | فعالية انزيم الثرمولايسين (وحدة/مل ×10) |
|---|---|
| وسط اساس | 120 |
| (NH4)2SO4 0.5% | 145 |
| NaCl 0.25%+MgSO4 0.5% | 130 |
| NaCl 0.25%+KCl 0.25% | 100 |
| NaCl 0.25%+CaCl 0.5% | 90 |
| NaCl 0.25%+(NH4)2SO4 0.5% | 85 |
| NaCl 0.25% | 125 |
| MgSO4 0.5%+(NH4)2 0.5% | 130 |
| MgSO4 0.5% | 160 |
| KCl 0.25%+(NH4)2SO4 0.5% | 170 |
| KCl 0.25% | 130 |
| CaCl2 0.5%+MgSO4 0.5% | 125 |
| CaCl2 0.5%+(NH4)2SO 0.5% | 10 |
| CaCl2 0.5%+ KCl 0.25% | 100 |
| CaCl 0.5% | 130 |
| KCl 0.25%+MgSO4%0.5% | 110 |

(استعمل الوسط الاساس 0.65% تربتون و0.5%مستخلص خميرة ولمدة 24 ساعة حضن بدرجة حرارة 55م).

يختلف هذا مع Chopra و Mathur (6) حيث وجد ان اضافة 0.5% من ملح كلوريد الصوديوم ادى الى زيادة الانتاج بنسبة 63%وقد وجد Haulon وجماعته (8)، Nigam وجماعته (13) وجدا ان أضافة ملح كلوريد الصوديوم أدت الى تثبيط انتاج انزيم مكون خثرة الحليب المنتج من *B.subtilus* وانزيم بروتيز من *Pseudomonas aerogenosa* وتعد أضافة الاملاح الى الوسط الزرعي عاملاً مهماً في الحفاظ على الانزيمات من المسخ. كما توفر الاملاح جواً مناسباً لتكوين الشكل الثلاثي الطبيعي للبروتين (6) حيث ان عدم وجود المعادن الايونية في الوسط الزرعي يؤدي الى الحصول على انزيم قليل الفعالية او معدوم الفعالية.

أدت أضافة سكرالكلوكوز او اللاكتوز او المالتوز او الفركتوز او الكالكتوز اوالسكروز اوالمانتول او الكلسرول او النشأ الذائب الى الوسط الزرعي المعقد الاساس الى انخفاض النمو وبالتالي الى انخفاض انتاج الانزيم نتيجة لأنخفاض الرقم الهيدروجيني لذلك تم تنظيم الرقم الهيدروجيني الى 7.5 بأستعمال منظم الفوسفات وتمت المقارنة مع الوسط الزرعي المعقد الاساس ذي رقم هيدروجيني 7 وقد وجد ان لسكريات السكروز والكلسرول والنشأ والمانتول تأثيراً مثبطاً في انتاج الانزيم جدول (6) وقد يعزى ذلك الى تنظيم الكبح الايضي. أختلف تأثير السكريات الاخرى في الانتاج حيث وجد ان تركيز 0.25 % سكر الكلوكوز قد ادى الى زيادة الانتاج بمقدار 25 وحدة/مل ×10 يليه 0.5% سكر الكالكتوز حيث ازدادت الفعالية الانزيمية بمقدار 20 وحدة/مل ×10 (جدول 7). وهذا يختلف مع ما وجده Chopra و Mathur (6) حيث اشارت نتائجهما الى ان استخدام السكريات قد ادى الى تثبيط انتاج الانزيم كما وجد Benitez (3) ان استخدام سكر الكلوكوز ادى الى انخفاض انتاج انزيم Hemagglutinin/protease في بكتريا *Vibrio cholerae*.

ولتثبيت التوليفة النهائية لوسط انتاج انزيم الثرمولايسين من العزلة *B. stearothermophilus* SK422 تمت المقارنة بين العوامل المضافة الى اوساط زرعية اساس احتوت على العوامل التغذوية التي اعطت انتاجية اعلى من وسط السيطرة بصورة مفردة او بصورة خلطية وقد وجد ان التوليفة النهائية لوسط انتاج انزيم الثرمولايسين هي 0.65% تربتون و0.5% مستخلص خميرة و0.5% كبريتات الامونيوم و0.25% كلوريد الكالسيوم و1%من المحلول الملحي المزيج و0.25% سكر كلوكوز وتعديل الرقم الهيدروجيني الى 7.5 بوساطة فوسفات البوتاسيوم القاعدية حيث ارتفعت نسبة الانتاجية 60 % على وسط السيطرة.

جدول 6: تأثير تركيز 1% سكر في انتاج انزيم thermolysin من العزلة *B.stearothermophilus* SK422

| المعاملة | فعالية انزيم thermolysin (وحدة/مل×10) |
|---|---|
| *وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7 | 110 |
| **وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 150 |
| كلوكوز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 160 |
| لاكتوز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 155 |
| مالتوز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 160 |
| فركتوز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 150 |
| كالكتوز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 160 |
| سكروز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 100 |
| مانتول +وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 110 |
| كلسرول+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 115 |
| نشاء ذائب+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 100 |

(*استعمل الوسط الاساس 0.65% تربتون و0.5%مستخلص خميرة وبعد 24 ساعة حضن بدرجة 55م).

(**استعمل الوسط الاساس 0.65% تربتون و0.5%مستخلص خميرة ورقم هيدروجيني 7.5ولمدة 24 ساعة حضن بدرجة حرارة 55م).

جدول 7: تأثير تراكيز مختلفة من السكريات في انتاج انزيم thermolysin من العزلة *B.stearothermophilus* SK422

| السكر المضاف الى الوسط الاساس | تركيز السكر % | فعاليةانزيمthermolysin (وحدة/مل×10) |
|---|---|---|
| *وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | - | 140 |
| كلوكوز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 0.25 | 165 |
| | 0.5 | 157 |
| | 1 | 150 |
| كالكتوز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 0.25 | 160 |
| | 0.5 | 155 |
| | 1 | 150 |
| لاكتوز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 0.25 | 150 |
| | 0.5 | 145 |
| | 1 | 140 |
| فركتوز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 0.25 | 155 |
| | 0.5 | 145 |
| | 1 | 140 |
| مالتوز+ وسط اساس ذي رقم هيدروجيني 7.5 | 0.25 | 150 |
| | 0.5 | 145 |
| | 1 | 140 |

*(استعمل الوسط الاساس 0.65% تربتون و0.5%مستخلص خميرة ورقم هيدروجيني 7.5 وبعد 24 ساعة حضن بدرجة 55م).

# المصادر


1- Amelunxen, R.E. and A.L. Murdock (1978). Life at high temperature Molecular Aspect. In: Microbiol life in extreme environments. (Ed kushner). p: 217. Academic press, NewYork.

2- Barker, A. N.; G.W. Gould and J. Wole (1971). Spore research Academic press. INC. London, New York.

3- Benitez, J.A.; A.J. Silva and R.A. Finkelstein (2001). Environmental signals controlling production of hemagglutinin/protease in *Vibrio cholerae*. Inf. Immun. 69 (10): 6549- 6553.

4- Boyer, H.W. and B.C. Carlton (1968). Production of tow proteolytic enzymes by a transformable strain of *Bacillus subtilis.* Arch. Biochem. Biophys. 128:442-455.

5- Brock, F.M.; C.W. Forsberg, and S.G. Buchanan (1982). Proteolytic activity of rumen microorganisms and effect of proteinase inhibitors. J. Appl. Environ. Microbiol, (44): 561-569.

6- Chopra, A.K. and D.K. Mathur (1983). Factors affecting protease production by *Bacillus stearothermophilus* RM-67. J. of Food Protection, 46:1020-1032.

7- Claus, D. and R.C.W. Berkeley (1986). Genus *Bacillus* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2) (ed. Sneath, P. H.). The Williams and Wilkins company Baltimore.

8- Foda, M.S.; A.A. Ismail and M.A. Khorchid (1977). Biochemical properties of a bacterial renin produced from whey. Milchwissensshaft 32:21. (cited by Chopra, A. K. and Mathur, D. K. (1983).

9- Haulon, G. H.; N.A. Hodges and A.D. Russell (1982). The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracine by *Bacillus licheniformis.* J. Gen. Microbiol., 128: 845-851.

10- **International commission on microbiological specification for food (ICMSF). (1980). Microbial Ecology of Foods, Vol. I, II Acad. press, NewYork, London, Toronto. Sydney. Sanfrancisco.**

11- **Ito, K. A. (1981). Thermophilic organisms in food spoilage: flat– sour– Aerobes. J. Food Prot., 44 (2): 157–163.**

12- **Latt, S.A.; B., Holmquist and B. L., Vallee (1969). Thermolysin: a zinc metaloenzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun., 37: 333-339.**

13- **Nigam, J.M.; K.R., Pillai and N., Barnahj (1981). Effect of carbon and nitrogen sources on neutral proteinases production by *Pseudomonas aeruginosa*. Folia Microbiol., 26: 358-363.**

14- **Norris, J. R.; R.W. Berkeley; N.A. Logan and A.G. O`Donell (1981). The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria (Eds. Star, M. P. *et al.*): 1727 – 1737. Springer – Verlag Berlin.**

15- **Obrien, R. T. and L. L. Campbell (1957). Purification and properties of a proteolytic enzyme by *Bacillus stearothermophilus*. Arch. Biochem. Biphys, 70: 432.**

16- **Rao, M.B.; M. A. Tanksale; M.S. Chatge and V.V. Deshpande (1998). Molecular and Biotechnological aspects of Microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62 (3): 597 -635.**

17- **Sander, R. L. and B.K. May (1975). Evidence for extrusion of unfolded extracellular enzyme polypeptide chains through membranes of *Bacillus ameloliquefaciens*. J. Bacteriol., 123: 806-814.**

18- **Takeshi, H.; A. Barbara; M. Booth and F. Boesman (1987). Comparative study of *Vibrio cholerae* Non-O1 protease and soluble Hemagglutinin with those of *Vibrio cholerae* O1. J. Infection and Immunity, 19 (2): 451–454.**

19- **Thompson, P.J. (1981). Thermophilic organism spore forming aerobes. J. Food Protection, 44:154- 156.**

20- **Van den burg, B.; G. Vriend; O.R. Veltman; G. Venema and V.G.H. Eijsink (1998). Engineering an enzyme to resist boiling. Proc. Natl. Acad. Sci., 95: 2056-2060.**

# ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THERMOLYSIN PRODUCING ISOLATES OF *Bacillus stearothermophilus* FROM IRAQI SOIL AND DETERMINATION OF NUTRITION FACTORS

**K. A. Al-Khafaji**

## ABSTRACT

***Bacillus stearothermophilus*** **spores are the most resistant for extreme environmente, their spores are abundant in all soil types at hot and cold regions.**

**This species produce Thermolysin (extracellular metalloprotease) which resist high temperature. The production of thermolysin is affected positively or negatively by the addition of some nutrition factors to basal medium. This research was conducted to isolate and identify *B. stearothermophilus* from different Iraqi soils and the determination of nutrition factors that affect the enzyme production.**

**Thirty three thermophilic bacterial isolates identified as B. *stearothermophilus* from twenty five different Iraqi soil samples.**

**The production of thermolysin enzyme was screened qualitatively and quantitavely and the isolates showed different quantity of enzyme production. The isolate designed as *B. stearothermophilus* SK 422 produced the highest amount of thermolysin reached to 900 unit/ ml.**

**The complex basal medium contained tryptone and yeast extract was used and the ideal concentration of each tryptone and yeast extract for enzyme production was determined to be 0.65% and 0.5% respectively. Soytone (soy bean digest) or peptone or pantone could replaced the tryptone without any clear effect on enzyme production. The effect of some salts concentration was determined separately or as mixture and found that the best concentration was 0.25% for NaCl and KCl, while it was 0.5% for MgSO4, CaCl2 and (NH4)2SO4. A mixture of 0.25% KCl, 0.5% (NH4)2SO4 gave higher enzyme production compared with using the salts separately. The effect of adding sugars (hexose ,pentose, polysaccharide, polyole)to the basal medium was studied on the enzyme production .The sugars which have positive effect was 0.25% glucose then 0.5% galactose.**

**Ministry of Sci. and Tech., Baghdad, Iraq.**